

Résumé

Les palmacées cultivées sont attaquées par de nombreuses espèces de chenilles défoliatrices, surtout de la famille des *Limacodidae*. Ces chenilles sont presque toujours infectées naturellement par des virus spécifiques. Des tests de diagnostic (ELISA, sonde nucléique), mis au point pour chaque virus intéressant, permettront l'analyse épidémiologique de ces maladies virales au champ et l'étude de la persistance des particules virales dans une population de chenilles. Ils faciliteront la décision d'une intervention par une détection rapide et sensible des virus dans une population de chenilles. Des succès ont été obtenus avec des préparations artisanales de virus de *Sethothosea asigna* et *Setora nitens*, en Indonésie et sur *Sibine fusca* en Colombie. Cette dernière a été éliminée par la pulvérisation aérienne d'une solution virale contenant l'équivalent de 10 chenilles mortes par hectare traité.

Abstract

Cultivated palms are affected by numerous leaf-eating caterpillar species, particularly from the *Limacodidae* family. These caterpillars are almost always naturally infected by specific viruses. Diagnosis tests (ELISA, nucleic probes) developed for every virus of interest will enable an epidemiological analysis of virus diseases in the field and a study of virus particle persistence in caterpillar populations. They make it easier to decide whether to intervene, by rapidly and accurately detecting viruses in caterpillar populations. Basic preparations of the viruses of *Sethothosea asigna* and *Setora nitens* in Indonesia and *Sibine fusca* in Colombia have proved successful, this last insect being eradicated by aerial spraying of a viral solution containing the equivalent of 10 dead caterpillars per hectare treated.

Resumen

Las palmeáceas cultivadas son atacadas por numerosas especies de larvas defoliadoras, sobre todo de la familia de los *Limacodidae*. Estas larvas se hallan casi siempre infectadas naturalmente por virus específicos. Pruebas de diagnóstico (ELISA, sonda nucleica), instrumentadas para cada virus interesante, permitirán analizar de manera epidemiológica estas enfermedades virales en el campo y estudiar la persistencia de las partículas virales en una población de larvas. Facilitarán la decisión de una intervención mediante una detección rápida y sensible de los virus en una población de larvas. Se lograron éxitos con preparaciones artesanales de virus de *Sethothosea asigna* y *Setora nitens*, en Indonesia y sobre *Sibine fusca* en Colombia. Esta última fue eliminada mediante pulverización aérea de una solución viral que contiene el equivalente de 10 larvas muertas por hectárea tratada.

Lutte biologique avec des virus entomopathogènes Application aux ravageurs du palmier à huile et du cocotier*

Philippe R.¹, Veyrunes J.C.², Mariau D.¹, Bergoin M.²

¹ CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

² INRA-CNRS, 30380 St Christol-lez-Alès, France

En Amérique, en Asie et en Afrique, les palmacées cultivées subissent d'importantes attaques d'insectes défoliateurs appartenant principalement aux familles des *Scarabaeidae* *Dynastinae* (*Coleoptera*) et des *Limacodidae* (*Lepidoptera*). De nombreuses maladies à virus ont été signalées sur ces ravageurs phytophages : il s'agit du *Baculovirus oryctes* (= *Rhabdionvirus oryctes*) sur larves d'*Oryctes rhinoceros* (*Dynastinae*) (Huger, 1966). Les diverses maladies virales des *Limacodidae* ont été énumérées par Entwistle (1987).

L'utilisation de virus, comme moyen de lutte biologique, en substitution aux pesticides chimiques, contre les ravageurs des palmeraies et des cocoteraies, nécessite auparavant des recherches approfondies au laboratoire. Celles-ci conduisent à la mise au point d'outils de diagnostic de la présence de virus (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou ELISA, sonde nucléique froide). Parallèlement, les études de terrain analysent l'épidémiologie des maladies virales chez les insectes et les facteurs éco-

logiques favorables au développement de ces virus.

Dès 1975, à l'instigation de l'IRHO⁽¹⁾, les premières déterminations des virus entomopathogènes et les premiers essais en plantations sur *Limacodidae* ont été réalisés.

Les études ont d'abord porté sur le *Densovirus* de *Sibine fusca* Stöhl (Meynadier *et al.*, 1977), puis sur le *Baculovirus* de *Natada pucara* Dognin (Genty *et al.*, 1978), deux *Limacodidae* du palmier à huile en Amérique du Sud (Colombie).

Dans les années 80 et 90, d'autres virus ont été détectés : un *Picornavirus* et un *Baculovirus* sur *Latoia viridissima* Holland (Zeddard *et al.*, 1990 ; Kouassi *et al.*, 1991), deux particules virales à ARN⁽²⁾ sur *Pteroteinon laufella* Hewitson (Herder *et al.*, 1994) et une autre sur *Turnaca rufisquamata* (Fédière *et al.*, 1992) en Côte d'Ivoire.

En Indonésie, de nombreuses études sur les maladies de *Limacodidae* ont pu déterminer, au cours des années 80, la nature des agents pathogènes en cause. Ainsi, chez *Sethothosea asigna* la maladie « laiteuse » est due à un *Réovirus* responsable de cette polyédrose cytoplasmique et la maladie « dé-

* La teneur de cet article a fait l'objet d'une communication présentée au 27^e anniversaire et Convention annuelle du *Pest management council of the Philippines* (PMCP) « *Pest management research and development for global competitiveness* » de Davao (Philippines), du 7 au 10 mai 1996.

⁽¹⁾ Ex-Institut de recherche sur les huiles et oléagineux.

⁽²⁾ Acide ribonucléique.

liquescence » résulte de l'action d'un virus du groupe *β-Nudaurelia*. Ce dernier se retrouve également dans les chenilles de :

- *Darna trima* Moore en mélange avec 2 autres types de virus comme les *Picornavirus* et les *Baculovirus* ;
- *Birtheosea bisura* Moore ;
- *Parasa lepida* Cramer où on peut aussi trouver un *Baculovirus* (Desmier de Chenon *et al.*, 1988).

Cet article présente le bilan et les résultats obtenus par les actions menées par le CIRAD-CP⁽³⁾, en collaboration avec la station INRA⁽⁴⁾ de St Christol-Lez-Alès et l'université Montpellier II. L'étude d'un virus de *Limacodidae* est décrite à titre d'exemple. La conduite de ces études sur les virus d'insectes y est détaillée.

Bilan de l'utilisation des maladies virales contre les ravageurs des palmacées cultivées

Les premiers tests au laboratoire ont confirmé la facilité de transmettre ces maladies virales en pulvérisant un broyat de chenilles mortes sur des chenilles saines. Ensuite, les essais de pulvérisation au champ, avec des atomiseurs à dos ou par voie aérienne, ont conforté ces résultats. Ainsi, en 1975 en Colombie, 20 jours après une pulvérisation de l'équivalent d'un broyat de 20 g de chenilles mortes dans 20 l de suspension/ha, un succès spectaculaire a été obtenu sur plusieurs centaines d'hectares infestés par les chenilles de *Sibine fusca* (Genty et Mariau, 1975).

En Afrique de l'Ouest, en 1984, un traitement terrestre, avec un appareil à pression préalable, de suspensions de picornavirus de 425, 1 900 et 3 700 g de chenilles *Latoia viridissima* malades/ha, ont entraîné des mortalités de 11, 44 et 61 % une semaine après l'application. Quinze jours plus tard, la mortalité était équivalente sur l'ensemble des zones traitées ainsi que sur le témoin, qui a été lui aussi contaminé, puisqu'il n'était pas très éloigné des zones traitées. En 1985, sur 10 ha de palmiers à huile, 2 suspensions de densovirus préparées avec 50 et 100 chenilles *Casphalia extranea*, appliquées par hélicoptère, ont donné, 5 jours plus tard, des mortalités de

72 et 81 % alors que celle du témoin n'était que de 28 % (Fédière *et al.*, 1990).

Ainsi, l'utilisation des virus comme insecticide biologique s'avère possible. Cependant, malgré parfois des réussites spectaculaires, la réalisation de traitements, utilisant des suspensions virales de type artisanal, doit respecter des délais de mise en œuvre. Il est nécessaire de surmonter des contraintes de spécificité, de production, de méthodes d'application et d'évaluer l'innocuité des préparations virales vis-à-vis des vertébrés.

Selon l'expérience indonésienne, le coût d'un traitement avec une suspension virale, sur *Setothosea asigna*, est 3,6 fois moins cher qu'un traitement classique avec un insecticide de contact. A efficacité égale, il est 5,9 à 11,5 fois moins cher qu'un traitement par absorption racinaire avec un insecticide systémique (Sipayung *et al.*, 1990).

Matériel et méthodes

La caractérisation et l'identification des virus, ainsi que l'élaboration des tests de diagnostic (ELISA, sonde nucléique froide) peuvent être réalisées par le CIRAD en collaboration étroite avec les laboratoires de l'INRA et de l'université de Montpellier.

Les techniques de caractérisation des virus sont bien définies :

- clarification à 410 g des broyats d'insectes malades ou morts dans une solution tampon à pH neutre ;
- purification des particules virales par ultracentrifugation en gradient de densité de Rénografine (méthylglucamine) ; les bandes bleutées, prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur, ont été introduites dans des boudins à dialyse ; ces derniers ont ensuite été immergés dans du tampon phosphate pendant 72 h ;
- observation au microscope électronique en contraste négatif pour déterminer la morphologie et les dimensions des particules ;
- analyse des caractéristiques physico-chimiques des virus détectés dans l'espèce de chenille étudiée (poids moléculaire, densité) ; l'analyse spectrophotométrique de ces suspensions virales purifiées est réalisée avec un spectrophotomètre UV ;
- dosage chimique des protéines virales et détermination de leur nombre par électrophorèse ;
- analyse des génomes viraux pour déterminer leur nature (ADN⁽⁵⁾ ou ARN) et leur taille ;

- cartographie, clonage et séquençage du génome viral.

L'obtention d'anticorps spécifiques, à partir de suspensions virales purifiées doit permettre la mise au point d'un test ELISA très spécifique à la détection du virus étudié. Un antisérum contre ces types de particules est préparé à partir d'un lapin qui reçoit 3 injections espacées d'une semaine, d'un mélange de solution virale purifiée et d'adjuvant de Freund. La sensibilité de cet antisérum est analysée par la technique immuno-enzymatique de *dot-blot* sur membrane de nitrocellulose. Cette réaction immuno-enzymatique repose sur la détection d'antigènes viraux à l'aide d'anticorps marqués avec une enzyme. Le complexe antigène-anticorps, immobilisé dans des cupules en plastique, pourra facilement être révélé par l'addition d'un substrat spécifique qui, en activant l'enzyme, va produire une couleur visible à l'œil nu ou quantifiable au moyen d'un spectrophotomètre ou d'un colorimètre.

La seconde méthode de diagnostic repose sur le principe de détection d'un acide nucléique viral, ADN ou ARN, par hybridation spécifique avec une sonde nucléique froide. Celle-ci est constituée d'une chaîne nucléique de polarité complémentaire à celle recherchée, marquée à la digoxigénine ou à la biotine.

Cette technique est également très sensible, simple et rapide. Contrairement à la précédente, elle ne nécessite aucun appareillage de lecture coûteux. Elle s'applique aussi bien sur du matériel purifié que sur des broyats cellulaires ou tissulaires bruts directement déposés sur des membranes de nylon (technique de *dot-blot*). Les sondes, stables à -20°C, ne subissent pas de perte d'activité et peuvent être réutilisées plusieurs fois avec des résultats réguliers et reproductibles. De plus, si l'on dispose comme sonde d'une séquence clonée dans un plasmide, ce qui est généralement le cas, sa préparation est très rapide et aisément renouvelable. Une telle sonde est capable de détecter l'équivalent de 5 pg d'ADN ou d'ARN viral.

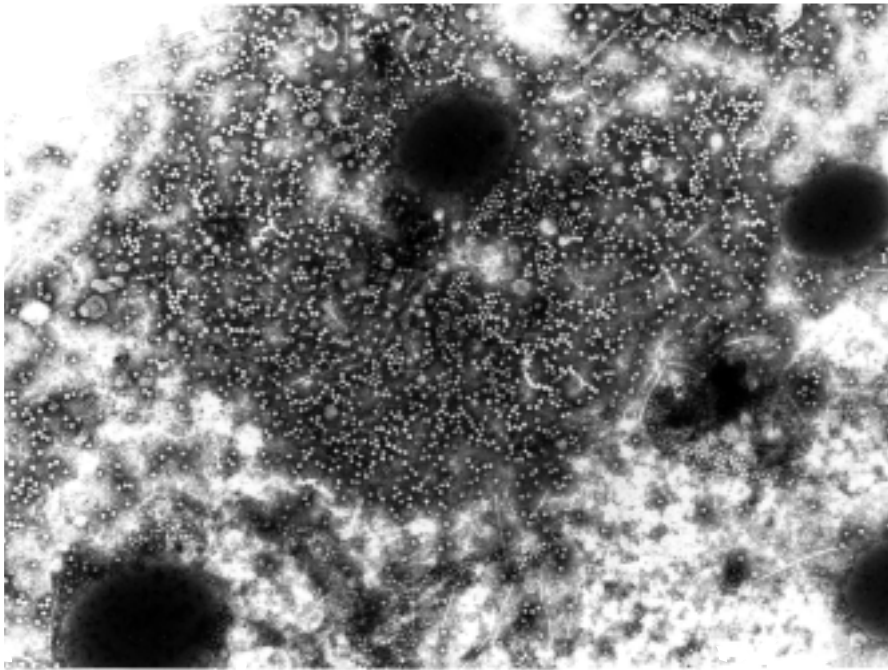
Avec ces deux techniques on dispose :

- d'une détection rapide et sensible des virus dans une population de chenilles défoliatrices, ce qui aide à la décision d'une éventuelle intervention biologique ;
- d'un suivi de l'extension de la maladie virale au sein de cette population d'insectes nuisibles, après un traitement à base de particules virales, afin d'enrichir l'inoculum de départ ;

⁽³⁾ Département des cultures pérennes du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

⁽⁴⁾ Institut national de la recherche agronomique.

⁽⁵⁾ Acide désoxy-ribonucléique.



J.C. Veyrunès

Densovirus des chenilles de *Sibine* sp. en contraste négatif avec l'acide phosphotungstique. Photo originale : grossissement x 20 000. / *Densovirus of Sibine* sp. caterpillars in negative contrast with phosphotungstic acid. Original photo: enlarged 20,000 x.

- d'une vérification permanente de la fiabilité des suspensions virales préparées;
- d'un titrage précis de ces suspensions virales, ce qui facilite l'estimation des doses à appliquer par hectare ;
- d'une étude de la persistance dans la nature des particules virales sur le substrat végétal.

Les études épidémiologiques permettent de mieux connaître la répartition des particules virales dans la couronne foliaire d'un palmier ou d'un cocotier et, ensuite, de suivre l'extension de la maladie au sein d'une parcelle, puis d'une plantation.

Etude du virus de *Sibine* sp.

A titre d'exemple, un virus d'une espèce de *Sibine*, ravageur polyphage des cultures au Pérou, a été étudié en collaboration étroite avec le laboratoire de pathologie comparée de Montpellier.

Purification du virus

L'examen au microscope électronique, de différentes suspensions de chenilles broyées dans de l'eau distillée, provenant d'une plantation péruvienne, a révélé des particules de type *Densovirus* d'environ 20 à 25 nm (photo) et un autre type de particules, proches des *β-Nudaurelia* d'environ 30 à 40 nm représentant environ 1 % de l'ensemble des particules visibles.

Analyse du virus

Le nombre et le poids moléculaire des protéines virales ont été déterminés par électrophorèse en gel de polyacrylamide et 4 protéines ont été ainsi mises en évidence chez ce densovirus.

Leurs poids moléculaires : VP1 = 77 300 Da ; VP2 = 70 600 Da ; VP3 = 55 500 Da ; VP4 = 42 900 Da, montrent bien qu'ils sont situés dans la gamme des valeurs des poids moléculaires de 5 autres *Densovirus* connus (tableaux 1 et 2). Dans le cas de ce densovirus de *Sibine* sp., on a pu estimer

qu'un ml de suspension virale purifiée titrant une unité de densité optique (UDO) contient environ 75 µg de protéines. En général, on sait que pour une suspension purifiée de densovirus, 1 UDO correspond à 100 µg par ml de virions soit 65 µg/ml de protéines et 35 µg/ml d'ADN.

Parentés immunologiques avec d'autres densovirus

Des résultats positifs ont été obtenus en utilisant de fortes dilutions de l'antisérum (jusqu'à 1/8 000^e) préparées avec une suspension de densovirus purifiés de *Sibine* sp.. Une dilution au 1/1 000^e de cet antisérum permet de détecter la présence de densovirus dans une suspension purifiée titrant 11 UDO. Cette technique a été ensuite utilisée pour vérifier les communautés antigéniques entre le *Densovirus* de *Sibine* sp. (Pérou) et d'autres *Densovirus* isolés de différents insectes. Les résultats de cette analyse montrent qu'il n'existe pas de communauté antigénique entre le *Densovirus* de *Sibine* sp. et les *Densovirus* de moustique, de *Lymantria dispar* (*Lymantriidae*), de *Junonia coenia* (*Nymphalidae*), de *Galleria mellonella* (*Pyrilidae*), d'*Acheta domestica* (*Gryllidae*), de *Diatraea saccharalis* (*Pyrilidae*), de *Sibine* sp. 1 et sp. 2. En revanche, des parentés sérologiques existent avec le *Densovirus* de *Casphalia extranea* et avec le *β-Nudaurelia* de *Setothosea asigna*. La parenté sérologique avec *β-Nudaurelia* peut être due à la présence de 1 % de particules de type *β-Nudaurelia* dans les suspensions de virus de *Sibine* sp.. Par ailleurs, lorsque le *Densovirus* de *Sibine* sp. est mis en présence de l'antisérum antiviral de *Diatraea saccharalis*, de ceux de *Casphalia extranea* et de *Setothosea asigna*, les réactions sont positives à très positives avec ces 3 antisérums.

Technique ELISA

La technique ELISA révèle qu'à la dilution au 1/2 000^e de l'antisérum de lapin antidénsovirus de *Sibine* sp., il est possible de détecter une quantité minimale d'environ 1 ng par 100 µl de protéines. Elle a été appliquée sur un lot de chenilles de *Sibine* sp. qui

Tableau 1. Poids moléculaires de *Densovirus* d'insectes. / Molecular weights of insect *Densovirus*es.

Protéines Proteins	<i>Sibine</i> sp. Pérou <i>Sibine</i> sp. Peru	<i>J. coenia</i>	<i>J. coenia</i>	<i>C. extranea</i>
PV1	77 300	109 600	101 000	82 000
PV2	70 600	70 800	68 000	74 000
PV3	55 500	58 700	58 000	54 000
PV4	42 900	41 900	49 000	49 000
Auteurs /Authors		Kelly et al., 1980 b	Fédière, 1983	Fédière, 1983

Tableau 2. Poids moléculaires de <i>Densovirus</i> d'insectes. / <i>Molecular weights of insect Densoviruses.</i>					
Protéines /Proteins	<i>G. mellonella</i>	<i>G. mellonella</i>	<i>B. mori</i> VDN1	<i>B. mori</i> VDN2	<i>A. vanillae</i>
PV1	98 000	107 300	77 000	70 000	110 000
PV2	69 800	70 900	70 000	73 000	72 000
PV3	58 500	61 100	57 000	55 000	62 000
PV4	49 000	42 600	50 000	53 000	43 000
Auteurs /Authors	Tijssen <i>et al.</i> , 1976	Kelly <i>et al.</i> , 1980 b	Nakagaki et Kawase, 1980	Maeda <i>et al.</i> , 1982	Kelly <i>et al.</i> , 1980 a

avaient été traitées avec des broyats de chenilles malades mises en suspension au Pérou puis rapportées en France, 10 jours après le traitement. Trois catégories ont été distinguées : chenilles malades entièrement brunes, chenilles à face ventrale jaunâtre, chenilles sans symptômes extérieurs visibles. Le test révèle que toutes les chenilles sont infectées par le *Densovirus*, même celles qui ne montraient pas de symptômes extérieurs.

Méthode d'utilisation des virus contre les ravageurs

Les essais de pulvérisation sont réalisés à partir de suspensions virales clarifiées, de fabrication artisanale. La suspension-mère est préparée, juste avant l'emploi, en utilisant des chenilles infectées, broyées dans de l'eau distillée ou, mieux encore, dans une solution bactéricide à base d'azoture de sodium (0,02 %). Une filtration avec une toile mousseline élimine les débris de cuticule et de poils urticants. Les chenilles malades ou mortes, stockées à - 20°C dans un congélateur, conservent leur pouvoir infectieux pendant plusieurs années si la chaîne du froid n'est pas rompue.

Les essais de traitements sont d'abord effectués sur une petite parcelle de jeunes palmiers, au niveau de quelques palmes bien infestées, avec un pulvérisateur à pression préalable ou avec un atomiseur à moteur dorsal. Ensuite, à l'échelle d'un bloc de palmiers ou de cocotiers en rapport, il est conseillé, pour obtenir une bonne distribution du biopesticide dans le feuillage, d'utiliser un puissant pulvérisateur porté ou tracté par un tracteur. Dans une palmeraie en début d'infestation, avec de jeunes stades larvaires, où la défoliation n'est pas encore sensible, la thermonébulisation peut être réalisée avec un Pulsfog K22 Bio Tous ces essais de traitement servent à déterminer la dose optimale du virus à utiliser comme agent biologique.

Des essais de protection des particules virales (adjonction de charbon, de lait, de sucre ou de produits anti-UV) doivent être également effectués pour maintenir leur virulence sous des conditions abiotiques

peu favorables (excès de radiations solaires).

La mise au point d'une telle méthode de lutte biologique nécessite également des études sur les relations hôte-parasite pour définir l'activité du virus en fonction du stade larvaire de l'insecte. Ainsi, il est possible de connaître la rapidité avec laquelle se manifeste la maladie, en fonction de la mortalité obtenue et de la quantité de particules virales observée dans le corps de chenilles mortes en fonction de leur poids. Il est également intéressant d'étudier la dynamique des populations hôtes-parasites, au cours d'une épidémiologie naturelle, en analysant la répartition des chenilles infectées par un virus dans la couronne foliaire des palmacées cultivées.

L'analyse de la transmission des virus (par les prédateurs, les parasitoïdes du ravageur ou encore par les adultes du ravageur lui-même) et du devenir du virus sur les feuilles apporte alors des précisions sur la persistance de ces germes pathogènes dans la nature.

Production massive de virus entomopathogènes

Deux méthodes se présentent :

- la première consiste à infecter, dans des petits manchons de mousseline, les chenilles saines récoltées au champ, avec de fortes doses de suspension-mère. Les chenilles mortes après traitement sont immédiatement stockées au congélateur ;
- la seconde consiste à ramasser directement et rapidement au champ un grand nombre de chenilles mortes tombées au sol après un traitement viral, avec, cependant, l'inconvénient d'obtenir des chenilles chargées de particules de terre. Avec cette méthode, la production massive de virus est toujours tributaire de la pullulation de l'espèce de chenille considérée. Il faut donc disposer d'un élevage permanent de l'insecte hôte, au laboratoire. Ceci implique soit la mise au point d'une méthode d'élevage de l'insecte-hôte d'origine, soit des essais d'adaptation des virus intéressants à d'autres es-

pèces d'insectes qui s'élèvent facilement sur milieu artificiel.

Pour mettre les virus à l'abri d'une dégradation les rendant inutilisables dans le cadre d'une lutte biologique, il est aussi nécessaire de déterminer leurs conditions de conservation. De même, il est important de préciser si les chenilles prélevées présentaient, au moment du stockage, des symptômes avancés ou très avancés de la maladie.

Différents procédés de conservation doivent être testés pour définir les conditions de stockage (5°C au réfrigérateur ou - 20°C au congélateur avec ou sans azoture de sodium).

Il est intéressant de déterminer si des cycles successifs congélation-décongélation entraînent, ou non, une destruction des particules virales.

Conclusion

L'analyse du virus de *Sibine* sp. au laboratoire montre bien que la première phase d'étude sur ces maladies virales consiste à réaliser la prospection, l'identification du matériel infecté et la caractérisation de ces virus. Viennent ensuite : la mise au point d'une méthode de diagnostic utilisable sur le terrain, l'estimation des potentialités d'utilisation, de spécificité ou de polyspécificité avec une analyse des gammes d'hôtes. La méthode d'utilisation de ces particules virales reste artisanale tant qu'il n'est pas possible de réaliser, au laboratoire, une multiplication massive de l'hôte.

Perspectives

Les résultats de l'étude du virus d'un ravageur déterminé permet d'orienter l'expérimentation sur le terrain, qui aura pour but de définir la rapidité d'infection des particules virales, la persistance de leur pouvoir pathogène, leur mode de dispersion, leur résistance aux facteurs abiotiques (rayons UV, hautes températures, faible humidité) ainsi que les modes de traitement. Enfin, il sera utile d'évaluer l'innocuité des préparations virales vis-à-vis des vertébrés. ■

Bibliographie / References

- DESMIER DE CHENON R., MARIAU D., MONTSARRAT P., FÉDIÈRE G., SIPAYUNG A., 1988. Recherches sur les agents entomopathogènes d'origine virale chez les lépidoptères défoliateurs du palmier à huile et du cocotier. *Oléagineux* 43 (3) : 107-117.
- ENTWISTLE P.F., 1987. Virus diseases of *Limacodidae*. In : Slug and Nettle caterpillars, M.J.W. Cock, H.C.J. Godfray, J.D. Holloway éd., Wallingford, Royaume-Uni, CAB International, p. 213-221.
- FÉDIÈRE G., 1983. Recherches sur des viroses épizootiques de lépidoptères *Limacodidae* ravageurs de palmacées. Thèse de doctorat 3^e cycle, université sciences et techniques du Languedoc, Montpellier, France, 103 p.
- FÉDIÈRE G., PHILIPPE R., VEYRUNES J.C., MONTSARRAT P., 1990. Biological control of the oil palm pest *Latoia viridissima* (Lepidoptera, Limacodidae) in Côte d'Ivoire, by a new picornavirus. *Entomophaga* 35 : 347-354.
- FÉDIÈRE G., LERY X., KOUASSI N., HERDER S., VEYRUNES J.C., MARIAU D., 1992. Etude d'un nouveau virus à ARN isolé de *Turnaca rufisquamata* (Lepidoptera-Notodontidae), défoliateur du palmier à huile, en Côte d'Ivoire. *Oléagineux* 47 (3) : 107-112.
- GENTY P., DESMIER DE CHENON R., MORIN J.P., KORYTOWSKY C.A., 1978. Les ravageurs du palmier en Amérique latine. *Oléagineux* 33 (7) : 325-419.
- GENTY P., MARIAU D., 1975. Utilisation d'un germe entomopathogène dans la lutte contre *Sibine fusca* Stohl (Limacodidae). *Oléagineux* 30 (8-9) : 349-354.
- HERDER S., FÉDIÈRE G., KOUASSI N., LERY X., KOUVIDJIN R., PHILIPPE R., MARIAU D., 1994. Mise en évidence de nouveaux virus à ARN chez *Pteroteinon laufella* Hewitson (Lepidoptera, Hesperidae), défoliateur du palmier à huile en Côte d'Ivoire. *Oléagineux* 49 (2) : 43-47.
- HUGER A.M., 1966. A virus disease of the Indian rhinoceros beetle *Oryctes rhinoceros* caused by a new type of insect virus, *Rhabdionvirus oryctes*. *J. Invertebr. Pathol.* 8 (1) : 38-51.
- KELLY D.C., AYRES M.D., SPENCER L.K., RIVERS C.F., 1980 a. Densonucleosis virus 3: a recent insect parvovirus isolate from *Agraulis vanillae* (Lepidoptera : Nymphalidae) *Microbiologica* 3 (4) : 455-460.
- KELLY D.C., MOORE N.F., SPILLING C.R., BARWISE A.H., WALKER I.O., 1980 b. Densonucleosis virus structural proteins. *J. virol.* 36 : 224-235.
- KOUASSI N., FÉDIÈRE G., LERY X., PHILIPPE R., BERGOIN M., 1991. Mise en évidence d'un baculovirus de polyédrose nucléaire chez *Latoia viridissima* (Lepidoptera, Limacodidae) ravageur du palmier à huile et du cocotier en Côte d'Ivoire. *Oléagineux* 46 (2) : 53-59.
- MAEDA S., KAWAI T., WATANABE H., 1982. Protein characteristics of a densonucleosis virus of the silkworm, *Bombyx mori*. In : Abstracts 3rd international colloquium invertebrate pathology, Brighton, Royaume-Uni, p. 222.
- MEYNADIER G., AMARGIER A., GENTY P., 1977. Une virose de type densonucléose chez le Lépidotère *Sibine fusca* Stollh. *Oléagineux* 32 (8-9) : 357-361.
- NAKAGAKI M., KAWASE S., 1980. Structural proteins of densonucleosis virus isolated from the silkworm *Bombyx mori* infected with the flacherie virus. *J. Invertebr. Pathol.* 36 : 166-171.
- SIPAYUNG A., DESMIER DE CHENON R., SUDHARTO P., 1990. Recent work with viruses in the biological control of leaf-eating caterpillars in North-Sumatra Indonesia. *Bull. Marihat* 9 (3) : 14-32.
- TJUSSEN P., VAN DEN HURK J., KURSTAK E., 1976. Biochemical, biophysical, and biological properties of densonucleosis virus. I. Structural proteins. *J. Virol.* 17 : 686-691.
- ZEDDAM J.L., PHILIPPE R., VEYRUNES J.C., FÉDIÈRE G., MARIAU D., BERGOIN M., 1990. Etude du ribovirus de *Latoia viridissima* Holland, ravageur de palmacées en Afrique de l'Ouest. Caractérisation. Diagnostic sérologique. Suivi épidémiologique. *Oléagineux* 45 (11) : 493-500.

Biological control using entomopathogenic viruses Application to oil palm and coconut pests*

Philippe R.¹, Veyrunes J.C.², Mariau D.¹, Bergoin M.²

¹ CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

² INRA-CNRS, 30380 St Christol-lez-Alès, France

In America, Asia and Africa, cultivated palms suffer from severe attacks by leaf-eating insects, primarily from the Scarabaeidae, Dynastidae (Coleoptera) and Limacodidae (Lepidoptera) families. Numerous virus diseases have been observed on these plant-eating pests, for instance *Baculovirus oryctes* (= *Rhabdionvirus oryctes*) on *Oryctes rhinoceros*

(Dynastidae) larvae (Huger, 1966). The various virus diseases of Limacodidae were listed by Entwistle (1987).

The use of viruses as a biological control method to replace chemical pesticides against oil palm and coconut pests calls for in-depth laboratory research beforehand. This research makes it possible to develop virus diagnosis tools (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay or ELISA, cold nucleic probes). At the same time, field studies can analyse virus disease epidemiology in insects and the ecological factors propitious to virus development.

As early as 1975, at the instigation of IRHO⁽¹⁾, the first entomopathogenic virus determinations

and the first field trials were carried out on Limacodidae.

Studies began with the Densovirus of *Sibine fusca* Stöll (Meynadier *et al.*, 1977), followed by the Baculovirus of *Natada pucara* Dognin (Genty *et al.*, 1978), two Limacodidae on oil palm in South America (Colombia).

Other viruses were detected in the 1980s and 90s: a Picornavirus and a Baculovirus on *Latoia viridissima* Holland (Zeddham *et al.*, 1990; Kouassi *et al.*, 1991), two RNA⁽²⁾ virus particles

⁽¹⁾ Ex-Institut des huiles et oléagineux (oil crops research institute).

⁽²⁾ Ribonucleic acid.

* The contents of this article were first presented as a paper at the 27th Anniversary and Annual Convention of the Pest Management Council of the Philippines (PMCP) on «Pest management research and development for global competitiveness» in Davao (Philippines), from 7th to 10th May 1996.

on *Pteroteinon lauffella* Hewitson (Herder *et al.*, 1994) and another on *Turnaca rufisquamata* (Fédière *et al.*, 1992) in Côte d'Ivoire.

Numerous studies of Limacodidae diseases in Indonesia in the 1980s determined the type of pathogens involved. For example, in *Setothosea asigna*, "milky" disease is due to a Reovirus responsible for this cytoplasmic polyhedrosis and "deliquescent" disease is the result of a β -Nudaurelia type virus which is also found in the caterpillars of:

- *Darna trima* Moore, mixed with two other types of virus such as Picornaviruses and Baculoviruses;
- *Birtheosea bisura* Moore;
- *Parasa lepida* Cramer, where a Baculovirus is also found (Desmier de Chenon *et al.*, 1988).

This article assesses the results obtained by CIRAD-CP⁽³⁾, in conjunction with the INRA⁽⁴⁾ station at St Christol-Lez-Alès and the University of Montpellier II. The study of a virus of *Limacodidae* is described as an example, along with the methods for studying insect viruses.

Results of using virus diseases against pests of cultivated palms

The first laboratory tests confirmed that these virus diseases can easily be transmitted by spraying healthy caterpillars with liquidized dead caterpillars. Field spraying trials with knapsack sprayers or from the air confirmed these results. In Colombia, a spectacular result was obtained in 1975, 20 days after spraying several hundred hectares infested with *Sibine fusca* caterpillars with the equivalent of 20 g of liquidized dead caterpillars in 20 l of suspension/ha.

Treatment from the ground in West Africa in 1984 using compressed air apparatus with a Picornavirus suspension equivalent to 425, 1,900 and 3,700 g of diseased *Latoia viridissima* caterpillars/ha resulted in 11, 44 and 61% mortality respectively a week after application. However, a fortnight later, the mortality rate was much the same for all the treatments and the control, which was also contaminated, since it was not far from the treated zones. In 1985, two Densovirus suspensions prepared with 50 or 100 *Casphalia extranea* caterpillars were applied from a helicopter and resulted in 72 to 81% mortality 5 days later, compared to just 28% for the control (Fédière *et al.*, 1990).

It is therefore indeed possible to use viruses as biological insecticides, though despite some spectacular successes, it will be some time

before rudimentary virus suspensions can be used as treatments. Certain constraints relating to specificity, production and application methods will have to be overcome and the innocuousness of the viral preparations with respect to vertebrates needs to be assessed.

Based on experience in Indonesia, treating *Setothosea asigna* with a viral suspension costs 3.6 times less than normal treatments with a contact insecticide. For the same effect, it is 5.9 to 11.5 times cheaper than treatment by root uptake using a systemic insecticide (Sipayung *et al.*, 1989).

Material and methods

Virus characterization and identification and the development of diagnosis tests (ELISA, cold nucleic probes) can be carried out by CIRAD, in close liaison with the laboratories at INRA and the University of Montpellier.

The techniques for virus characterization are clearly defined:

- clarification at 410 g of liquidized diseased or dead insects in a buffer solution with a neutral pH;
- purification of viral particles by Renografine (methylglucamine) density gradient ultracentrifugation; the blue bands are drawn off with a Pasteur pipette and placed in dialysis tubes which are then immersed in a phosphate buffer for 72 hours;
- observation as a negative image under an electron microscope to determine particle morphology and size;
- analysis of the physico-chemical characteristics of the viruses detected in the caterpillar species studied (molecular weight, density); a spectrophotometric analysis of these purified viral particles is carried out with a UV spectrophotometer;
- the number of viral particles and their weight are determined chemically by electrophoresis;
- the viral genomes are analysed to determine their type (DNA⁽⁵⁾ or RNA) and size;
- viral genome mapping, cloning and sequencing.

Obtaining specific antibodies from purified virus suspensions should make it possible to develop an ELISA test highly specific to the detection of the virus studied. An antiserum against these types of particles is prepared from a rabbit given three weekly injections of a mixture of purified viral solution and Freund's adjuvant. The sensitivity of the antiserum is then analysed by the dot-blot enzyme immunoassay technique on a nitrocellulose membrane. This immunoenzymatic reaction is based on detecting viral antigens using enzyme-labelled antibodies. The antigen-antibody complex is immobilized in

plastic wells, and can easily be developed by adding a specific substrate which, by activating the enzyme, will produce a stain that is either visible to the naked eye or can be detected by a spectrophotometer or colorimeter.

The second diagnosis method is based on detecting a viral nucleic acid, DNA or RNA, by specific hybridization with a cold nucleic probe. The probe comprises a nucleic chain whose polarity is complementary to the one being sought, marked with digoxigenin or biotin.

This technique is also very sensitive, simple and quick. Unlike the above technique, it does not require any costly read-out apparatus. It can be applied both to purified material and to unrefined liquidized cells or tissues deposited directly on nylon membranes (dot-blot technique). The probes, which are stable at -20°C, do not lose any of their activity and can be re-used several times with consistent, reproducible results. Moreover, if the probe is a cloned sequence in a plasmid, as is generally the case, it is easy to prepare and can be replaced without any problems. Such probes can detect the equivalent of 5 pg of viral DNA or RNA.

These two techniques will enable:

- rapid, sensitive detection of viruses in leaf-eating caterpillar populations, which will help with the decision whether to implement biological control;
- monitoring of the spread of a virus disease within the insect pest population following virus particle-based treatments to enrich the initial inoculum;
- ongoing checks of the reliability of the viral suspensions prepared;
- precise titration of these viral suspensions, which will facilitate determination of the doses to be used per hectare;
- a study of the persistence of viral particles on the plant substrate in the wild.

Epidemiological studies provide a clearer picture of viral particle distribution in the leaf crown of oil palms or coconut palms and of disease spread within a plot or plantation.

Study of the virus of *Sibine* sp.

As an example, a virus of a *Sibine* species, a polyphagous crop pest in Peru, was studied in conjunction with the comparative pathology laboratory in Montpellier.

Virus purification

The examination under the electron microscope of different liquidized diseased caterpillar suspensions in distilled water revealed Densovirus type particles measuring around 20 to 25 nm (photo) and another type of particle similar to β -Nudaurelia measuring 30 to 40 nm, representing around 1% of all the particles visible.

⁽³⁾ Tree Crops Department of the *Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement*.

⁽⁴⁾ *Institut national de la recherche agronomique*.

⁽⁵⁾ Deoxyribonucleic acid.

Analysis of the virus

The number of viral proteins and their molecular weight were determined by polyacrylamide gel electrophoresis and four proteins were detected in this Densovirus.

Their molecular weights: VP1 = 77,300 Da; VP2 = 70,600 Da; VP3 = 55,500 Da; VP4 = 42,900 Da, clearly show that they are within the range of molecular weight values for five other known Densoviruses (tables 1 and 2). In the case of this Densovirus of *Sibine* sp., we estimated that one ml of purified viral suspension titring at one unit of optical density (UOD) contained around 75 µg of proteins. In general, it is known that for a purified Densovirus suspension, 1 UOD corresponds to 100 µg of virions per ml, i.e. 65 µg of proteins/ml and 35 µg of DNA/ml.

Immunological similarities with other Densoviruses

Positive results were obtained with highly diluted antiserum (up to 1/8,000), prepared with a suspension of purified *Sibine* sp. Densovirus. Diluting the antiserum at 1/1,000 enabled detection of the Densovirus in a purified suspension with a titre of 11 UOD. The technique was then used to check the antigenic similarities between the Densovirus of *Sibine* sp. (Peru) and other Densoviruses isolated from different insects. The results of the analysis showed that there were no antigenic similarities between the Densovirus of *Sibine* sp. and the Densoviruses of mosquitoes, *Lymantria dispar* (Lymanitidae), *Junonia coenia* (Nymphalidae), *Galleria mellonella* (Pyralidae), *Acheta domestica* (Gryllidae), *Diatraea saccharalis* (Pyralidae), and *Sibine* sp. 1 and sp. 2. However, there were serological similarities with the Densovirus of *Casphalia extranea* and the β-Nudaurelia of *Setothosea asigna*. The serological relationship with β-Nudaurelia may be due to the existence of 1% β-Nudaurelia type particles in the *Sibine* sp. virus solutions. Moreover, when the Densovirus of *Sibine* sp. was placed in contact with the antisera against the viruses of *Diatraea saccharalis*, *Casphalia extranea* and *Setothosea asigna*, the reactions were positive to highly positive with all three antisera.

ELISA technique

The ELISA technique revealed that at a dilution of 1/2,000 of rabbit antiserum against the *Sibine* sp. Densovirus, it was possible to detect a minimum quantity of around 1 ng per 100 µl of proteins. It was applied to a batch of *Sibine* sp. caterpillars treated with liquidized diseased caterpillars placed in suspension in Peru and brought back to France 10 days after treatment. Three categories were revealed: diseased, entirely brown caterpillars, caterpillars with a yellowish ventral side and caterpillars with no

visible external symptoms. The test showed that all the caterpillars were infected with the Densovirus, even those with no external symptoms.

Method for using viruses against pests

Spraying trials are carried out with viral suspensions prepared and clarified on a small scale. The stock suspension is prepared just before use, with liquidized infected caterpillars in distilled water or, better still, in a bactericide solution containing sodium hydrazone (0.02%). The suspension is filtered through muslin to remove any cuticle debris or stinging hairs. If stored in the freezer at -20°C, diseased or dead caterpillars can conserve their infection capacity for several years, provided they are not taken in and out of cold storage too often.

Treatment trials are first carried out on a few severely infested fronds in small plots of young palms, using a compressed air sprayer or a motorized knapsack sprayer. In plots of bearing oil palms or coconut palms, it is best to use powerful tractor mounted or drawn sprayers to ensure effective biopesticide distribution in the leaf crown. Hot fogging with a Pulsfog K22 Bio can be used in plantations in the initial stages of infestation with young larval instars, when palm defoliation is not too severe. All of these treatment trials help to determine the optimum virus dose to use as the biological agent.

Viral particle protection trials (adding charcoal, milk, sugar or anti-UV products) should also be carried out to maintain their virulence under unfavourable abiotic conditions (excessive sunlight).

The development of such a biological control method also calls for studies of host-parasite relations to define virus activity depending on the larval instar of the insect. It will therefore be possible to ascertain the rapidity with which the disease appears, depending on the mortality obtained and the quantity of viral particles observed in the bodies of dead caterpillars in relation to their weight. It is also worth studying host-parasite population dynamics during natural epizootics by analysing the distribution of caterpillars infected by a virus in the leaf crown of cultivated palms.

An analysis of virus transmission (by predators or parasitoids of the pest or by adult pests themselves) and of what happens to the virus on the leaves could provide details of the persistence of these pathogenic germs in the wild.

Mass production of entomopathogenic viruses

Viruses can be produced in two ways:

- the first method is to infect healthy caterpillars collected in the field, in muslin sleeves, with

strong doses of stock suspension. The caterpillars that die after treatment are immediately stored in the freezer;

- the second method is to directly and rapidly collect a large number of dead caterpillars from the ground after viral treatments in the field, although this does have the drawback that the caterpillars are covered in soil particles. With this method, mass virus production always depends on population levels of the caterpillar species in question.

It is therefore essential to rear the host insect continuously in the laboratory. This means either developing a method for rearing the original host-insect or carrying out trials to adapt interesting viruses to other insect species that are easier to rear in the laboratory on an artificial medium.

It is also essential to determine the conditions for virus storage, to protect them from any deterioration that would make them unusable for biological control. It is important to record whether the caterpillars collected have initial, advanced or very advanced symptoms of the disease when they are placed in storage.

Different preservation procedures should be tested to define storage conditions (5°C in the refrigerator or -10°C in the freezer, with or without sodium hydrazone).

It would also be worth seeing whether successive freezing-thawing destroys the viruses.

Conclusion

The laboratory analysis of the virus of *Sibine* sp. clearly showed that the first step in studying these virus diseases is to survey and identify the infected material and characterize the viruses. The next step is to develop a diagnosis method applicable in the field and estimate the prospects for its use and its specificity or multiple specificity by analysing a range of hosts. The virus particle method will only be suitable on a small scale until it is possible to mass produce the host in the laboratory.

Prospects

The results of studies on the virus of a given pest can be used to steer field trials with a view to defining the infection speed of the viral particles, the persistence of their pathogenic capacity, how they spread, their resistance to abiotic factors (UV rays, high temperatures, low humidity) and treatment methods. Lastly, it would be worth evaluating the innocuousness of the viral suspensions to vertebrates. ■